

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz

Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Kewitz

**PHARMAKOKINETIK UND STOFFWECHSEL
VON METHYLPROSCILLARIDIN
BEIM MENSCHEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Hans Peter Faßbender aus Köln

1977

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz

Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Kewitz

**PHARMAKOKINETIK UND STOFFWECHSEL
VON METHYLPROSCILLARIDIN
BEIM MENSCHEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Hans Peter Faßbender aus Köln

Referent: Prof. Dr. med. Norbert Rietbrock

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Ruiz-Torres



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3. August 1977

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
1.1. Chemie und Wirkung der Herzglykoside	6
1.2. Zur Geschichte der Scilla-Glykoside	8
1.3. Zur Pharmakologie von Methylproscillaridin	8
2. Methodik	10
2.1. Versuchssubstanzen	10
2.2. Versuchspersonen	10
2.3. Versuchsablauf	13
2.3.1. Repetitierte orale Applikation von Methylproscillaridin	13
2.3.2. Einmalige orale Applikation von Methylproscillaridin	13
2.4. Analytische Verfahren	14
2.4.1. Dosisrückbestimmung	14
2.4.2. Aufarbeitung der Plasmaproben	15
2.4.2.1. Bestimmung der Gesamtradioaktivität	15
2.4.2.2. Bestimmung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität	15
2.4.3. Aufarbeitung der Urinproben	16
2.4.3.1. Bestimmung der Gesamtradioaktivität	16
2.4.3.2. Bestimmung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität	16
2.4.3.3. Extraktion der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität	16
2.4.3.4. Aufarbeitung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität	18
2.4.3.5. Hydrolytische Spaltung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität durch Inkubation mit β -Glucuronidase	18
2.4.4. Aufarbeitung der Stuhlproben	19
2.4.4.1. Homogenisierung der Stuhlproben	19
2.4.4.2. Bestimmung der Gesamtradioaktivität	20

	Seite
2.4.4.3. Bestimmung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität	20
2.4.4.4. Extraktion und Reinigung der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität	20
2.4.5. Aufarbeitung der Galleproben	21
2.4.5.1. Bestimmung der Gesamtradioaktivität	21
2.4.5.2. Bestimmung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität	21
2.4.5.3. Extraktion der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität	21
2.4.5.4. Hydrolytische Spaltung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität durch Inkubation mit β -Glucuronidase	22
2.5. Dünnschichtchromatographische Trennverfahren	22
2.6. Radioaktivitätsmessung	24
2.7. Statistische Auswertung	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Pharmakokinetik der Gesamtradioaktivität in Plasma, Urin und Stuhl nach repetierter Applikation von 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin bei 3 gesunden Probanden	25
3.2. Methylproscillaridin und seine Metaboliten	28
3.2.1. im Plasma	28
3.2.2. im Urin	29
3.2.3. in den Faeces	34
3.3. Pharmakokinetik der Gesamtradioaktivität in Plasma, Urin, Stuhl und Galle nach einmaliger oraler Gabe von 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin bei vier Patienten mit Choledochus-T-Drainage	35
3.4. Methylproscillaridin und seine Metaboliten	40
3.4.1. im Plasma	40
3.4.2. im Urin	41
3.4.3. in den Faeces	42
3.4.4. in der Galle	42
4. Diskussion	45

5.	Zusammenfassung	51
6.	Literaturverzeichnis	53



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549022_0011

1. Einleitung

1.1. Chemie und Wirkung der Herzglykoside

Die herzwirksamen Glykoside gehören mit Cholesterin, Gallensäuren, Sexual- und Nebennierenrindenhormonen zur großen Gruppe der Steroide. Gemeinsam ist ihnen das Cyclopentanoperhydrophenanthren - Gerüst (Abb. 1).

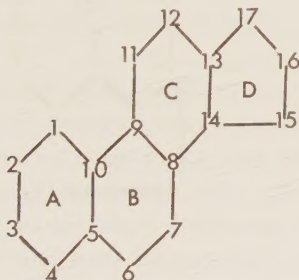


Abb. 1: Cyclopentanoperhydrophenanthren

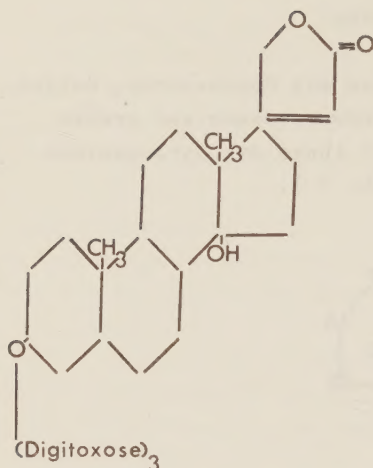
Das Unterscheidungsmerkmal der Herzglykoside zu den anderen oben erwähnten Steroidabkömmlingen ist die cis-trans-cis-Anordnung der im Cyclopentanoperhydrophenanthren verknüpften Ringe.

Für die herzwirksamen Glykoside charakteristische Substituenten sind

- a) in 3-Stellung ätherartig gebundene Zucker
- b) in 14-Stellung eine OH-Gruppe
- c) in 17-Stellung ein ungesättigter Lactonring

Je nachdem, ob der Lactonring 5- oder 6-gliedrig ist, unterscheidet man Cardenolide (Digitalis-, Strophantus-, Conval-laria-Glykoside) und Bufadienolide (Scilla-Glykoside und herzwirksame Krötengifte) (Abb. 2).

Digitoxin



Proscillaridin A

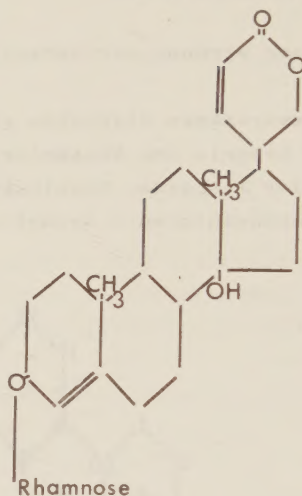


Abb. 2: Strukturformel eines Cardenolides (Digitoxin) und eines Bufadienolides (Proscillaridin A)

Für die Herzwirksamkeit von Bedeutung sind

- a) die cis-trans-cis-Verknüpfung
 - b) der in 17 β -Stellung vorhandene ungesättigte Lactonring
 - c) die 3-OH-Gruppe in β -Stellung.
- (ORZECZOWSKI 1960, DWENGER 1973)

Die Herzglykoside unterscheiden sich untereinander durch die am Kohlenstoffatom 3 in unterschiedlicher Anzahl ätherartig gebundenen Zucker. Durch Abspaltung der Zuckermoleküle entsteht aus dem Glykosid das Genin (= Aglucon).

Für die Herzwirksamkeit sind die Zucker nicht entscheidend, sie beeinflussen jedoch das physikochemische Verhalten im Organismus wie Resorption, Verteilung und Abbaugeschwindigkeit.

keit (CERLETTI 1960, REPKE 1966).

Die herzwirksamen Glykoside zeichnen sich vor allem durch ihre positiv inotrope Wirkung (Erhöhung der Kontraktionskraft) aus. Daneben weisen sie aber auch eine negativ chronotrope und dromotrope (Erniedrigung der Frequenz und Erregungsleitung) sowie positiv bathmotrope Wirkung (Erniedrigung der Reizschwelle) auf (STRAUB 1907, GOLD et al. 1938, LOUBATIERES 1951, BODEM et al. 1975).

1.2. Zur Geschichte der Scilla-Glykoside

Scilla maritima ist als Arzneimittel fast 3500 Jahre bekannt und wird schon im Papyrus Ebers erwähnt (ERBRING et al. 1958). Ihre Wirkstoffe stellten STOLL und SUTER 1921 als kristallisierten Reinglykosid-Komplex dar. 1922 wurde das Scillaren^R in die Therapie eingeführt (STRAUBE 1959).

Ihm folgte 1964 das Proscillaridin, das sich chemisch vom Scillaren durch das Fehlen einer Glucose unterscheidet (WÜLFING v.d. HEYDEN 1969).

1.3. Zur Pharmakologie von Methylproscillaridin

Zahlreiche klinische Studien über Proscillaridin (3 β -rhamnosido-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolid), ein kurz wirkendes Glykosid aus Scilla maritima, haben gezeigt, daß die Substanz nur eine geringe Resorption (18 - 39%) beim Menschen besitzt (KUBICEK et al. 1965, MEIER und WAGNER 1965, HÄNEL und MEIFFERT 1966, BELZ 1968, BUTZENGEIGER et al. 1967, HANSEL 1968, LÖSCHHORN 1969, WÜLFING v.d. HEYDEN 1969, GRÜBL et al. 1970), die Ausscheidung jedoch von der Nierenfunktion unabhängig ist (BELZ und BRECH 1973, 1974).

Nachdem KAISER (1971) und SCHAUMANN et al. (1972) gezeigt haben, daß durch Einführung einer Methylgruppe an der endständigen Digitoxose des Digoxins eine erhebliche Resorptionsbeschleunigung erzielt werden konnte, wurde analog am Proscillaridin eine Methylierung der Zuckerseitenkette vorgenommen, die zum Proscillaridin-4-methyläther führte (KU -

BINYI 1971).

BELZ et al. (1974 a) verglichen das Verhalten der Eliminationskonstante bzw. der Plasmahalbwertszeit von Methylproscillaridin bei acht Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und sechs gesunden männlichen Versuchspersonen. Sie stellten fest, daß sich die kinetischen Parameter in beiden Kollektiven kaum unterschieden.

RIETBROCK und STAUD (1975) untersuchten Pharmakokinetik und Metabolismus von Methylproscillaridin nach einmaliger Gabe bei fünf gesunden Probanden. Sie fanden eine Halbwertszeit der Gesamtradioaktivität im Plasma von 51 Stunden. Während der siebentägigen Beobachtungszeit wurden 20 % der Dosis mit dem Urin und 56 % der Dosis mit den Faeces ausgeschieden. 55 % der Gesamtradioaktivität im Plasma, 80 % der im Urin und 20 % der in den Faeces bestand aus CHCl_3 -unlöslichen Substanzen. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung des CHCl_3 -löslichen Anteils in Plasma und Urin zeigte zwei nicht identifizierte Metabolite. In den Faeces wurden mehr als 90 % der apolaren Fraktion als Methylproscillaridin identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war es,

1. das Kumulationsverhalten und den Metabolismus von Methylproscillaridin nach repetierter oraler Applikation zu untersuchen und
2. bei Patienten mit Choledochus-T-Drainage zu klären, ob die hohe faecale Ausscheidung von unverändertem Methylproscillaridin auf eine hohe biliäre Sekretion oder geringe intestinale Resorption zurückzuführen ist.

2. Methodik

2.1. Versuchssubstanzen

a) ^3H -Proscillaridin-4'-Methyläther; Chargen-Nr. III, Fr. III; spezifische Aktivität: 63 - 136 mCi/mMol; radiochromatographische Reinheit 96 % bzw. 92 %.

b) Methylproscillaridin in Tablettenform à 0.25 mg

c) Nicht-markierte Referenzsubstanzen*:

Proscillaridin-4'-methyläther, Proscillaridin, Scillarenin, 3 epi-Scillarenin, 7 β -OH-Scillarenin, 7 β -OH-3-epi-Scillarenin, 12 β -OH-Scillarenin, 12 β -OH-3 epi-Scillarenin, Scillarenon, 12 β -OH-Scillarenon.

2.2. Versuchspersonen

Die Untersuchungen nach repetierter oraler Gabe von Methylproscillaridin erfolgten an drei gesunden männlichen Probanden, die sich freiwillig zur Verfügung gestellt hatten und über den Versuch und seine Bedingungen in Gegenwart von Zeugen aufgeklärt worden waren.

Das mittlere Alter dieser Probanden betrug 24.7 Jahre, das mittlere Gewicht 68.0 kg (Tab. 1).

Eine normale Herz-, Leber- und Nierenfunktion war bei allen Probanden durch die üblichen klinischen Routineuntersuchungen gewährleistet.

* Für die freundliche Überlassung der Referenzsubstanzen danke ich der Firma KNOLL AG, Ludwigshafen

Proband	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Geschlecht
A.B.	24	65	m
B.E.	27	74	m
C.S.	23	65	m
$\bar{x}$	24.7	68.0	
	± 2.1	± 5.2	

Tab. 1: Alter, Gewicht und Geschlecht der drei gesunden Probanden

Die Untersuchungen nach einmaliger Gabe von Methylproscillaridin erfolgten an 3 weiblichen und 1 männlichen Patienten* mit Choledochus-T-Drainage nach Cholecystektomie. Die klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

* Ich danke Herrn Professor Dr. med. Rudolf Häring, Klinikum Steglitz, für die Erlaubnis, diese Untersuchungen an Patienten der chirurgischen Abteilung durchführen zu können.

Patient	I.D.	N.A.	I.T.	D.C.
Geschlecht	w	w	m	w
Alter (Jhr.)	53	59	66	58
Gewicht (kg)	50	59	72	67
Größe (cm)	164	161	172	157
Serum-K ⁺ (mVal/l)	5.38	3.40	3.91	4.02
S G O T (IE/l)	9	7	9	14
S G P T (IE/l)	32	5	10	12
alk.Phosph. (IE/l)	362	99	162	114
Diagnose	Choledocho- Cholelithi- asis AV-Block 1.Grades	Choledocho- Cholelithi- asis Hypertonus	Choledocho- Cholelithi- asis	Choledocho- Cholelithi- asis

Tab. 2: Klinische Daten der vier Patienten mit Choledochus -
T - Drainage

2.3. Versuchsablauf

2.3.1. Repetierte orale Applikation von Methylproscillaridin

Die gesunden Probanden kamen zur Durchführung des Versuchs täglich in die Klinik.

Vom 1. bis zum 7. Tag erhielten sie in genau 24-stündigem Abstand morgens nach einem Standardfrühstück 0.5 mg Methylproscillaridin in Tablettenform (2 Tabletten a 0.25 mg).

Vom 8. bis 11. Tag bestand die oral verabfolgte Dosis von 0.5 mg Methylproscillaridin aus 0.42 mg Methylproscillaridin in Tablettenform und 0.08 mg ^3H -Methylproscillaridin (± 20 uCi), das als Tracerdosis in 2 ml absolutem Äthanol gelöst war. Die Dosis wurde zusammen mit 100 ml Tee eingenommen.

10 ml Blut wurden vor der ersten Applikation und 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h, 240 h, 264 h, 288 h und 312 h nach Versuchsbeginn aus der Kubitalvene entnommen und heparinisiert.

Vom 8. bis 17. Tag nach Versuchsbeginn wurde der Urin in 24-Stunden-Portionen, der Stuhl in Einzelportionen gesammelt (Tab. 3).

Die Blutproben wurden sofort untersucht, Urin- und Stuhlproben bei -20°C tiefgefroren und innerhalb von 14 Tagen weiterverarbeitet.

2.3.2. Einmalige orale Applikation von Methylproscillaridin

Den Patienten mit Choledochus-T-Drainage wurde 24 h nach Cholecystektomie einmalig per os 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin in ca. 2 ml absolutem Äthanol gelöst zusammen mit 200 ml Tee verabreicht. Die Patienten waren bei Versuchsbeginn nüchtern.

Ca. 10 ml Blut wurden 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Versuchsbeginn aus der Kubitalvene entnommen und heparinisiert.

Urin und Galle wurden fraktioniert von 0 - 4 h, 4 - 8 h, 8 - 12 h, 12 - 24 h und danach in 24-stündigen Abständen bis zum Versiegen des Galleflusses gesammelt.

Der Stuhl wurde portionsweise gesammelt.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0.50 mg MP	+	+	+	+	+	+	+										
0.42 mg MP +20 uCi ³ H-MP								+	+	+	+						
Blut	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Urin							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 3 : Versuchsanordnung über die Gabe von 0.50 mg Methylproscillaridin bzw. 0.42mg Methylproscillaridin + 20 uCi ³H-Methylproscillaridin ($\pm$ 0.08 mg) an 11 aufeinanderfolgenden Tagen und Übersicht über die Sammelperioden von Blut und Urin.

2.4. Analytische Verfahren

2.4.1. Dosismrückbestimmung

Die zu applizierende Lösung wurde in einer vorher ausgewogenen Einmalspritze aufgezogen und das Gewicht der

Lösung bestimmt.

Nach Applikation wurden Spritze und Trinkbecher mehrfach mit 10 ml 98%igem Äthanol ausgespült. Vom Äthanol wurden 2 Aliquots von 0.5 ml mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt, die Restaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt und von der ursprünglich in der Spritze enthaltenen Radioaktivität zur Ermittlung der exakten Dosis abgezogen.

2.4.2. Aufarbeitung der Plasmaproben

Die Blutproben der gesunden Probanden vom 1. bis zum 8. Tag nach oraler Gabe von Methylproscillaridin wurden zur Bestimmung der Plasmaspiegel von Herrn Dr. G. G. Belz (Universität Ulm) mit Hilfe des ⁸⁶Rb-Erythrocyten-Assays untersucht.

2.4.2.1. Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Plasma

Das heparinisierte Blut wurde bei 3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert.

Vom Plasma wurden 3 Aliquots von 0.5 - 1.0 ml entnommen, mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit und, zur Erreichung einer homogenen Verteilung der Radioaktivität im Zählköpfchen, mit Tixotropic Gel Powder (Fa. Packard) vermischt und zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler eingesetzt (A-Wert).

2.4.2.2. Bestimmung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität

Vom Plasma wurden 3 Aliquots von 1 - 2 ml entnommen, dreimal mit dem doppelten Volumen Chloroform 10 Minuten lang extrahiert und je 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert.

Zur Bestimmung der in der wässrigen Phase verbliebenen Radioaktivität wurden zwei Aliquots von 0.5 ml entnom-

men, mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen (B-Wert).

2.4.3. Aufarbeitung der Urinproben

2.4.3.1. Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Urin

Das Volumen der einzelnen Urinportionen wurde bestimmt, und zur direkten Messung der Gesamtradioaktivität von jeder Portion zweimal 0.2 ml entnommen, mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und die Aktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen (A-Wert).

2.4.3.2. Bestimmung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität

5 ml Urin wurden dreimal je 10 Minuten lang mit dem doppelten Volumen Chloroform ausgeschüttelt und je 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Von der wässrigen Urinphase wurden zwei Aliquots von 0.2 ml entnommen und zur Messung eingesetzt (B-Wert).

2.4.3.3. Extraktion der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität

Zur Extraktion der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität wurde Magnesiumtrisilicat (Florisil^R, Fa. Serva, Heidelberg; Korngröße 0.08 - 0.15 mm) verwandt, für das in Vorversuchen eine fast vollständige Absorption der CHCl_3 -löslichen Fraktion nachgewiesen werden konnte.

Ca. 60 g des mehrfach gewaschenen Florisils^R wurden in eine Glasfritte (Größe: D 3) gefüllt und das gesamte Volumen einer Urinprobe durch das Florisil^R filtriert. Das Volumen der im Durchlauf enthaltenen CHCl_3 -unlöslichen Fraktion wurde bestimmt und von diesem zweimal ein Aliquot von 0.1 ml zur Messung der Aktivität eingesetzt.

Anschließend wurde das Florisil^R zur Reinigung von

Farb- und Ballaststoffen solange mit Aqua dest. gespült, bis der Durchlauf klar und farblos war. Die Spülflüssigkeiten wurden vereinigt, das Volumen bestimmt, zweimal ein Aliquot von 0.2 ml entnommen und zur Messung der Aktivität eingesetzt (zur Weiterverarbeitung dieser Fraktion siehe Abschnitt 2.4.3.4.).

Die an das Florisil^R adsorbierte Radioaktivität wurde mit 200 ml Chloroform/Methanol (v/v : 1/1) und 100 ml Äthanol eluiert.

Die Chloroform/Methanol- und Äthanol-Extrakte wurden in einem 500 ml Rundkolben am Rotationsverdampfer bei 37° C bis zur Trockne eingengt.

Die nach dem Einengen im Rundkolben verbliebene Radioaktivität wurde dreimal mit 10 ml Chloroform/Methanol (v/v : 1/1) und abschließend einmal mit 10 ml Äthanol aufgenommen, in ein mittleres Schliffglas überführt und unter Druckluft im Wasserbad bei 37° C bis zur Trockne eingengt.

Die im Schliffglas zurückgebliebene Radioaktivität wurde in 5 ml Aqua dest. aufgenommen, und von jeder Probe zweimal ein Aliquot von 0.1 - 0.2 ml zur Messung der Aktivität in den Flüssigkeitsscintillationszähler eingesetzt.

Die in Aqua dest. gelöste Radioaktivität wurde zur Beseitigung von lipophilen Verunreinigungen zweimal mit je 10 ml Petroleumbenzin (Artikel-Nr. 1773; Fa. E. Merck, Darmstadt; Siedebereich 50 - 75° C) 10 Minuten lang ausgeschüttelt, 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und die überschichtete Petroleumbenziphase mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt (Verlust an Radioaktivität < 2 %).

Anschließend wurde die Radioaktivität aus der gereinigten Wasserphase dreimal mit je 10 ml Chloroform 10 Minuten lang extrahiert.

Die Chloroformphasen wurden für die dünnschichtchromatographische Auftrennung in Spitzgläsern vereinigt

und im Wasserbad bei 37° C unter Druckluft eingeeengt.

Die in der Wasserphase verbliebene CHCl_3 -unlösliche Radioaktivität wurde zum Nachweis der Spaltbarkeit mit β -Glucuronidase, wie unter Abschnitt 2.4.3.5. beschrieben, weiterverarbeitet.

2.4.3.4. Aufarbeitung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität

Die nach Filtration durch Florisil^R erhaltene CHCl_3 -unlösliche Fraktion wurde am Rotationsverdampfer bei 37° C zu einem Volumen von 300 - 400 ml eingeeengt, in einen Scheidetrichter überführt und - nach einer Methode von BARLOW und KELLIE (1959) - mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50 g/100 ml) versetzt.

Nach vollständiger Lösung des Ammoniumsulfats wurde die wässrige Phase dreimal gegen das halbe Volumen Äther/Äthanol (v/v : 3/1) ausgeschüttelt. Die Äther/Äthanol-Phasen wurden vereinigt, das Volumen bestimmt und zur Radioaktivitätsmessung zweimal ein Aliquot von 0.1 ml eingesetzt, anschließend Überführung in einen 500 ml-Rundkolben und am Rotationsverdampfer bei 37° C bis zur Trockne eingeeengt.

Der Rückstand wurde in 10 ml Aqua dest. aufgenommen, in ein Schliffglas überführt, mit 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt und dreimal mit dem halben Volumen Äther/Äthanol (v/v : 3/1) ausgeschüttelt. Die Äther/Äthanol-Phasen wurden abpipettiert, unter Druckluft im Wasserbad bei 37° C zur Trockne eingeeengt und die verbliebene Radioaktivität zum Nachweis der Spaltbarkeit mit β -Glucuronidase (siehe Abschnitt 2.4.3.5.) weiterverarbeitet.

2.4.3.5. Hydrolytische Spaltung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität durch Inkubation mit β -Glucuronidase

Die chloroformunlösliche Fraktion wurde unter Druckluft im Wasserbad bei 37° C zur Trockne eingeeengt und anschließend in 5 ml Natriumacetat-Puffer aufgenommen

(der Natriumacetat-Puffer mit einem pH von 5.2 wurde aus 76.8 Teilen einer 0.1 n Natriumacetat-Lösung und 23.2 Teilen einer 0.1 n Essigsäure hergestellt).

Von dieser Lösung wurde 1 ml in ein Schliffglas abpipettiert und 4 ml Natriumacetat-Puffer hinzugegeben (Probe I).

Zu den restlichen 4 ml an chloroformunlöslicher Radioaktivität wurden 5 mg β -Glucuronidase (von Helix pomatia; spezifische Aktivität 3 U/mg; Fa. Boehringer, Mannheim; Kontroll-Nr. 7274105) gegeben (Probe II).

Beide Proben wurden für 24 Stunden im Wasserbad bei 37° C inkubiert, wobei Probe I als Kontrollprobe ohne Enzymzusatz diente.

Nach der Inkubation wurde von jeder Probe zweimal ein Aliquot von 0.2 ml entnommen und zur Messung der Radioaktivität in den Flüssigkeitsscintillationszähler eingesetzt (A-Wert).

Anschließend wurde jede Probe dreimal je 10 Minuten mit dem doppelten Volumen Chloroform ausgeschüttelt, 10 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert, die Chloroformphase in ein Spitzglas abpipettiert, unter Druckluft im Wasserbad bei 37° C zur Trockne eingengt und zur dünnenschichtchromatographischen Auftrennung aufgearbeitet.

Zur Messung der in der Natriumacetat-Phase verbliebenen Aktivität wurde zweimal ein Aliquot von 0.2 ml entnommen (B-Wert).

Zur Berechnung der enzymatischen Spaltung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität wurde von der Spaltung der enzymhaltigen Probe die der Kontrollprobe abgezogen.

2.4.4. Aufarbeitung der Stuhlproben

2.4.4.1. Homogenisierung der Stuhlproben

Die bei -20° C tiefgefrorenen Stuhlproben wurden auf

Zimmertemperatur erwärmt, das dreifache Volumen Aceton (DAB 7) hinzugegeben und die Proben mit einem Omni - mixer (Fa. Sorvall) 5 Minuten lang homogenisiert. Das Homogenat wurde in 200 ml-Zentrifugengläser gefüllt, 10 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert, nach Phasentrennung die Acetonphase in einen Meßzylinder dekantiert und die homogenen Kotrückstände erneut mit Aceton versetzt. Der gesamte Arbeitsvorgang wurde dreimal wiederholt.

2.4.4.2. Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Stuhl

Das Volumen der Acetonphase wurde gemessen, von ihr zweimal ein Aliquot von 0.2 ml entnommen, mit 0.2 ml H_2O_2 (30 Vol. %) für 48 - 72 Stunden gebleicht, und nach Entfärbung zur Messung der Gesamtradioaktivität eingesetzt (A-Wert).

2.4.4.3. Bestimmung der $CHCl_3$ -unlöslichen Radioaktivität

5 ml der Acetonphase wurden in ein Schliffglas pipettiert und bei $37^{\circ}C$ im Wasserbad zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit 5 ml Aqua dest. aufgenommen, dreimal gegen 10 ml Chloroform 10 Minuten lang ausgeschüttelt und 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurde zweimal ein Aliquot von 0.1 ml entnommen, mit 0.1 ml H_2O_2 (30 Vol. %) für 48 - 72 Stunden gebleicht und nach Zugabe von 10 ml Scintillationsflüssigkeit zur Messung eingesetzt (B-Wert).

2.4.4.4. Extraktion und Reinigung der $CHCl_3$ -löslichen Radioaktivität

Die Acetonphase wurde am Rotationsverdampfer bei $37^{\circ}C$ zur Trockne eingengt, mit 100 - 200 ml Aqua dest. wieder aufgenommen und zur Entfernung von groben Verun-

reinigungen filtriert.

Das Filtrat wurde über eine mit Florisil^R gefüllte Fritte gegeben und für die dünnsschichtchromatographische Auftrennung wie die Urinproben aufgearbeitet.

2.4.5. Aufarbeitung der Galleproben

2.4.5.1. Bestimmung der Gesamtradioaktivität in der Galle

Das Volumen der fraktioniert gesammelten Galleproben wurde gemessen, dreimal ein Aliquot von 0.2 ml entnommen, in einem Zählgefäß mit 1.5 ml Soluene^R/Isopropanol (v/v : 1/1) und 0.5 ml H₂O₂ (30 Vol. %) für 48 - 72 Stunden gebleicht und nach Zusatz von 10 ml Scintillationsflüssigkeit die Gesamtradioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen (A-Wert).

2.4.5.2. Bestimmung der CHCl₃-unlöslichen Radioaktivität

5 ml Galle wurden in ein Schliffglas pipettiert, dreimal mit dem doppelten Volumen Chloroform 10 Minuten lang ausgeschüttelt und 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Von der wässrigen Gallephase wurde dreimal ein Aliquot von 0.5 ml entnommen, gebleicht und zur Messung der Radioaktivität eingesetzt (B-Wert).

2.4.5.3. Extraktion der CHCl₃-löslichen Radioaktivität

Eine ausreichende Menge Galle (3 - 4 x 10⁶ dpm) wurde in einem Scheidetrichter dreimal gegen das doppelte Volumen Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformphasen in einem Rundkolben am Rotationsverdampfer bei 37° C zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde dreimal in je 10 ml Chloroform aufgenommen, in ein Schliffglas überführt und unter Druckluft im Wasserbad bei 37° C bis zur Trockne eingeengt.

Die im Schliffglas verbliebene Radioaktivität wurde in

5 ml Aqua dest. aufgenommen und für die dünnschicht - chromatographische Auftrennung wie die Urinproben aufgearbeitet.

2.4.5.4. Hydrolytische Spaltung der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität durch Inkubation mit β -Glucuronidase

Von der Galle wurde eine ausreichende Menge (3 - 4 x 10^6 dpm) mit dem halben Volumen Aceton (DAB 7) gefällt (Verlust an Radioaktivität: <5 %), 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand in einen Rundkolben dekantiert und am Rotationsverdampfer bei 37° C zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 5 ml Natriumacetat-Puffer aufgenommen. 1 ml dieser Lösung wurde mit 4 ml Natriumacetat-Puffer verdünnt (Kontrollbestimmung).

Zu den restlichen 4 ml wurde 1 ml ($\approx$ 5 mg) β -Glucuronidase hinzugefügt und beide Proben im Wasserbad bei 37° C für 24 Stunden inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben wie die Urinproben aufgearbeitet.

2.5. Dünnschichtchromatographische Trennverfahren

Die in Spitzgläsern eingeengten Rückstände von Urin, Stuhl und Galle wurden in 50 μ l Chloroform aufgenommen, inaktive Referenzsubstanzen zugegeben und auf Kieselgel-Platten (Fa. Merck, Darmstadt; 20 x 20 cm; Schichtdicke 0.25 mm) aufgetragen. Als Fließmittel diente Chloroform/Aceton (v/v : 1/1), die Fließstrecke betrug 15 cm, es wurde vierfach entwickelt.

Die radioaktiven Zonen wurden mit einem Radiochromatogramm-Scanner (Dünnschicht-Scanner II, LB 273, Fa. Berthold, Germany) lokalisiert. Eine Zuordnung der Peaks wurde durch UV-Fluoreszenz der inaktiven Referenzsubstanzen mit Hilfe von Kaiser's Reagenz (KAI - SER 1955). Die quantitative Auswertung der radioak -

tiven Zonen erfolgte mittels automatischer Integration (Dual Ratemeter-Integrator LB 242 K, Fa. Berthold, Germany).

Die R_f -Werte von Methylproscillaridin und seinen Metaboliten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Substanz	R_f -Wert
Methylproscillaridin	0.63
Proscillaridin	0.26
3 α -Scillarenin	
3 β -Scillarenin	
Scillarenon	0.87
12 β -OH-3epi-Scillarenin	0.61
P [*] ₁	0.16
P [*] ₂	0.37
P [*] ₃	0.47

P^{*} = unidentifizierte Metaboliten von Methylproscillaridin

Tab. 4: R_f -Werte von Methylproscillaridin und seinen Metaboliten.

Fließmittel: CHCl_3 /Aceton 1:1 (v:v), vierfache Entwicklung

2.6. Radioaktivitätsmessung

Die ^3H -Radioaktivität wurde in einem Packard Tri-Carb Liquid-Scintillation Spectrometer Model 3380 gemessen. Die Quenchkorrektur erfolgte durch die Kanalverhältnismethode mit einem Automatikzusatz Modell 544 unter Zuhilfenahme eines externen Standards. Als Scintillationsflüssigkeit wurden verwandt

a) 10 % Naphtalin, 0.98 % 2.5-Diphenyloxazol,
0.02 % 2.2-p-Phenylene-bis-(5-Phenyloxazol)
in Dioxan

b) Insta-Gel^R (Fa. Packard).

2.7. Statistische Berechnungen

Die Berechnungen der Mittelwerte $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$ und Standardabweichungen $S \bar{x} = \frac{\sqrt{s}}{n}$ wurden mit einem elektronischen Tisch-Computer (Olivetti Programma, Italy; Modell 101) ausgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Pharmakokinetik der Gesamtradioaktivität in Plasma, Urin und Stuhl nach repetitierter oraler Applikation von 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin bei drei gesunden Probanden

Der Verlauf der Gesamtradioaktivität im Plasma zeigte bei allen drei Probanden, daß sich 24 Stunden nach letzter Gabe ($\approx$ 96 Stunden nach Versuchsbeginn) ein Steady-State eingestellt hatte (Abb. 3). Die Konzentration betrug zu diesem Zeitpunkt im Mittel 0.21 % der Dosis/l Plasma (Tab. 5). Von der 24. bis zur 96. Stunde nach der letzten Applikation fallen die Konzentrationen exponentiell mit einer Halbwertszeit von im Mittel 30 Stunden ab (Abb. 3).

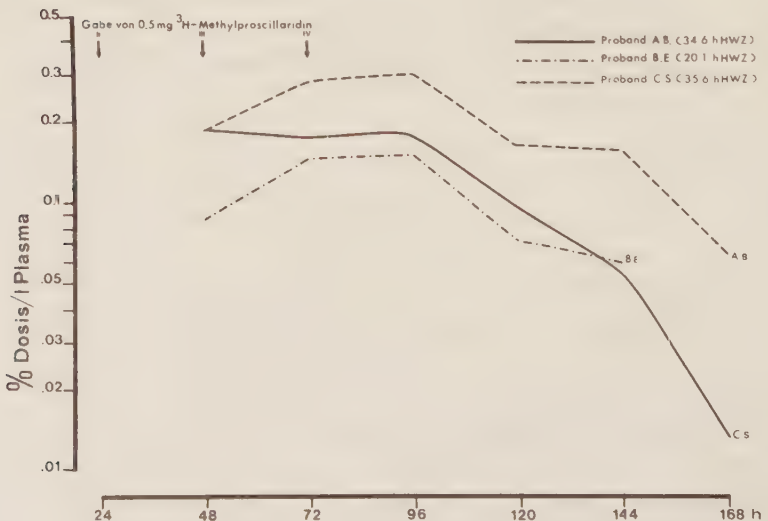


Abb.3: Konzentration der Gesamtradioaktivität im Plasma

Zeit h	Proband A.B.		Proband B.E.		Proband C.S.	
	% Dosis/l Plasma	CHCl ₃ -unlösli. (Rel.%)	% Dosis/l Plasma	CHCl ₃ -unlösli. (Rel.%)	% Dosis/l Plasma	CHCl ₃ -unlösli. (Rel.%)
48	0.1719	57.54	0.1674	49.85	0.0863	56.87
72	0.2846	60.56	0.1532	58.94	0.1448	62.74
96	0.3034	61.89	0.1727	-	0.1494	51.22
120	0.1237	-	0.0940	-	0.0714	-
144	0.1121	-	0.0549	-	0.0587	-
168	0.0630	-	0.0131	-	-	-
		$\bar{x} = 60.0$ ± 2.2		$\bar{x} = 54.5$ ± 6.4		$\bar{x} = 56.9$ ± 5.8

Tab. 5: Gesamtradioaktivität (in % der Dosis) und CHCl₃-unlöslicher Anteil im Plasma
48 - 168 Stunden nach der ersten Gabe von 0.5 mg ³H-Methylproscillaridin bei
drei gesunden Probanden

Zeit h	Proband A.B.		Proband B.E.		Proband C.S.	
	% Dosis	CHCl ₃ -unlösli. (Rel.%)	% Dosis	CHCl ₃ -unlösli. (Rel.%)	% Dosis	CHCl ₃ -unlösli. (Rel.%)
0 - 24	2.5	84.6	1.5	77.3	1.7	78.1
24 - 48	3.2	59.6	2.5	60.7	2.0	83.8
48 - 72	3.8	69.0	2.3	68.6	3.6	84.3
72 - 96	4.4	75.6	3.7	79.7	5.0	84.0
96 - 120	1.8	78.7	1.5	79.9	2.0	86.0
120 - 144	1.0	84.6	0.7	85.1	1.3	82.3
144 - 168	0.6	87.1	0.3	90.6	0.8	89.9
168 - 192	0.4	81.5	0.2	73.2	0.5	54.9
192 - 216	0.3	79.5	0.1	-	0.4	80.4
	$\Sigma = 18.0$	$\bar{x} = 77.0$ ± 4.8	$\Sigma = 12.8$	$\bar{x} = 76.0$ ± 9.4	$\Sigma = 17.1$	$\bar{x} = 80.4$ ± 10.1

Tab. 6: Ausscheidung der Gesamtradioaktivität (in % der Dosis) und CHCl₃-unlöslicher Anteil (in Rel.%)
im Urin innerhalb von neun Tagen nach Gabe von 4 x 0.5 mg ³H-Methylproscillaridin bei 3 gesunden
Probanden

Die im Urin während der Beobachtungsdauer ausgeschiedene Gesamtradioaktivität betrug 13 - 18 % der Dosis (Tab. 6). Mit den Faeces wurden im gleichen Zeitraum 47 - 68 % der Dosis ausgeschieden (Tab. 7).

Proband A.B.			Proband B.E.			Proband C.S.		
Zeit	% Dosis	CHCl ₃ -unlösli.	Zeit	% Dosis	CHCl ₃ -unlösli.	Zeit	% Dosis	CHCl ₃ -unlösli.
h		(Rel.%)	h		(Rel.%)	h		(Rel.%)
0- 2	3.1	10.6	0- 48	4.6	14.6	0- 26	7.1	11.5
2- 18	12.2	8.2	48- 60	25.6	17.2	26- 63	2.8	10.1
38- 74	11.3	6.6	60- 85	19.2	10.3	63- 75	15.4	7.7
74- 98	19.9	7.6	85-120	8.9	10.4	75- 99	8.9	9.1
98-158	9.8	6.9	120-144	5.2	10.5	99-159	2.9	11.2
158-198	3.6	2.3	144-152	3.9	18.3	159-171	5.9	11.1
			152-192	0.8	-	171-194	3.7	7.3
			192-216	0.6	-			
$\Sigma = 59.9$	$\bar{x} = 7.0$ +2.7		$\Sigma = 68.5$	$\bar{x} = 12.9$ +3.2		$\Sigma = 46.6$	$\bar{x} = 9.9$ +1.9	

Tab. 7: Ausscheidung der Gesamtradioaktivität im Stuhl (in % der Dosis) und CHCl_3 -unlöslicher Anteil (in Rel.%) während der Beobachtungszeit bei 3 gesunden Probanden nach Gabe von $4 \times 0.5 \text{ mg } ^3\text{H-Methylproscillaridin}$

Die Halbwertszeit der Gesamtradioaktivität im Harn betrug von der 48. bis zur 144. Stunde nach der letzten Applikation 28 Stunden (Tab. 8).

Proband	HWZ (h)
A.B.	30.78
B.E.	22.53
C.S.	32.04

$$\bar{x} = 28.45 \pm 5.17$$

Tab. 8: Halbwertszeit der Gesamtradioaktivität im Urin
bei drei Probanden

Abbildung 4 zeigt die kumulative Ausscheidung der Gesamtradioaktivität in Urin und Faeces:

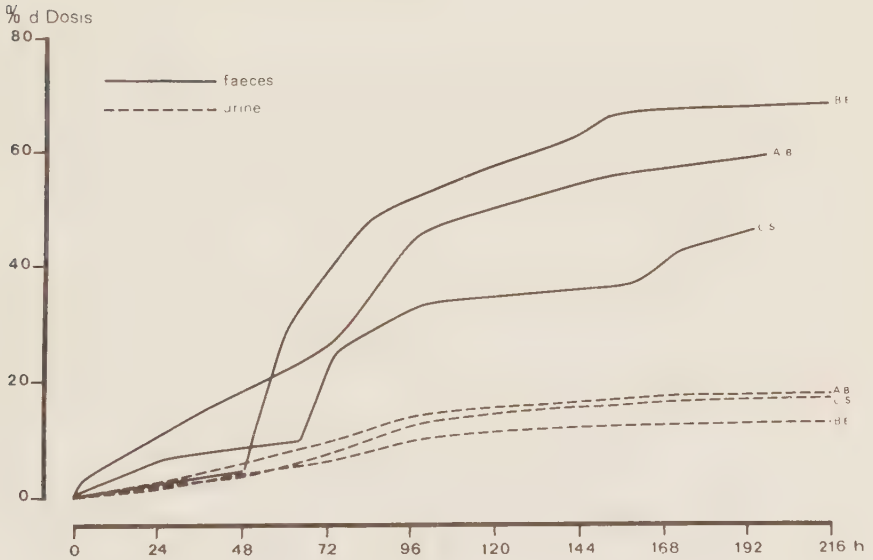


Abb 4

3.2. Methylproscillaridin und seine Metabolite

3.2.1. im Plasma

Die Gesamtradioaktivität wurde in eine CHCl_3 -lösliche und CHCl_3 -unlösliche Fraktion aufgeteilt. Der CHCl_3 -unlösliche Anteil betrug im Mittel 57.5 % (Tab. 5). Er veränderte sich während der Beobachtungszeit um weniger als 12 %.

Wegen der geringen Konzentration der CHCl_3 -löslichen

Radioaktivität war eine dünnschichtchromatographische Auftrennung dieser Fraktion nicht möglich.

3.2.2. im Urin

Die Gesamtradioaktivität wurde in eine CHCl_3 -lösliche und CHCl_3 -unlösliche Fraktion aufgeteilt.

Der CHCl_3 -unlösliche Anteil betrug im Mittel 78 % (Tab. 6). Während der Dauer der Applikation lag er bei 76 %, in der darauffolgenden Ausscheidungsphase bei 81 %.

Durch Inkubation mit β -Glucuronidase konnte die CHCl_3 -unlösliche Fraktion im Urin zu 39 % gespalten werden. Als CHCl_3 -lösliche Spaltprodukte liessen sich 97 % Methylproscillaridin und 1 % Proscillaridin nachweisen (Abb. 5).

Der CHCl_3 -lösliche Anteil betrug im Mittel 22 %. Durch dünnschichtchromatographische Auftrennung dieser Fraktion konnten im Urin Methylproscillaridin, Proscillaridin, Scillarenin (on) und die unbekannten Metaboliten P_1 , P_2 und P_3 nachgewiesen werden (Abb. 6).

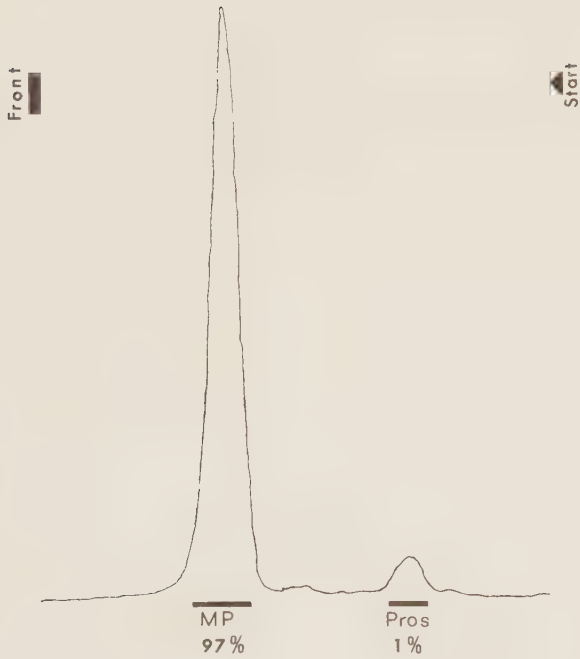


Abb. 5: CHCl_3 -lösliche Spaltprodukte im Urin nach Inkubation mit β -Glukuronidase



Abb. 6: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der $CHCl_3$ löslichen Fraktion der Radioaktivität im Urin

Die Haupts substanz der CHCl_3 -löslichen renal ausgeschiedenen Radioaktivität war der Metabolit P_2 (2.3 % der Dosis).

Sein Anteil an der CHCl_3 -löslichen Fraktion betrug bis zur 24. Stunde nach der letzten oralen Gabe 44 %. Während der darauffolgenden Abklingphase stieg der Anteil von P_2 bis auf 64 % an (Tab. 9).

Der Anteil des Proscillaridins an der CHCl_3 -löslichen Fraktion zeigte einen ähnlichen Verlauf. Während der Applikationsphase lag sein Anteil bei 9 %, in dem darauffolgenden Beobachtungszeitraum erhöhte er sich auf 12 % (Tab. 9).

Umgekehrt verhielt sich der Anteil von Metabolit P_3 an der CHCl_3 -löslichen Fraktion. Bis 24 Stunden nach der letzten Applikation betrug er 24 %. Im weiteren Verlauf konnten nur noch 5 % der CHCl_3 -löslichen Aktivität im Urin als P_3 nachgewiesen werden (Tab. 9).

P_3 war mit einem Anteil von 0.75 % der Dosis der zweite Hauptmetabolit der renal ausgeschiedenen CHCl_3 -löslichen Radioaktivität (Abb. 7).

Der Anteil von Methylproscillaridin (4 %), Scillarenin (on) (3 %) und P_1 (2 %) an der CHCl_3 -löslichen Fraktion blieb während der Beobachtungsdauer konstant (Tab. 9).
Abbildung 7 zeigt die kumulative Ausscheidung der CHCl_3 -löslichen Bestandteile im Urin in % der Dosis.

Zeit h	Gesamtradio- aktivität % d. Dosis	CHCl ₃ -löslich	P ₁	Prosc.	P ₂	P ₃	MP	Scilla- renin(on)
0- 24	1.9 ± 0.5	19.9 ± 4.0	2.5±0.8	7.8±1.2	32.8±7.2	27.6±6.0	3.9±1.1	4.4±2.0
24- 48	2.6 ± 0.6	32.0 ±13.7	2.5±1.6	9.4±0.6	46.6±10.6	18.8±4.1	3.1±1.6	2.3±0.6
48- 72	3.2 ± 0.8	26.0 ± 8.9	0.9±0.4	7.8±0.8	48.8±7.2	23.7±6.6	1.9±0.4	0.6±0.3
72- 96	4.4 ± 0.6	20.2 ± 4.2	2.1±0.4	9.6±1.3	48.3±8.4	23.2±0.4	4.2±2.8	2.0±0.2
96-120	1.8 ± 0.3	18.5 ± 3.9						
120-144	1.0 ± 0.3	16.0 ± 1.5						
144-168	0.6 ± 0.3	10.8 ± 1.9	3.3±0.2	11.7±4.6	63.7±16.3	4.5±2.2	4.0±2.1	5.4±0.3
168-192	0.4 ± 0.2	30.1 ±13.6						
192-216	0.3 ± 0.2	20.0 ± 0.6						

Tab. 9: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der CHCl₃-löslichen Fraktion
im Urin von 3 Probanden in Rel.-%

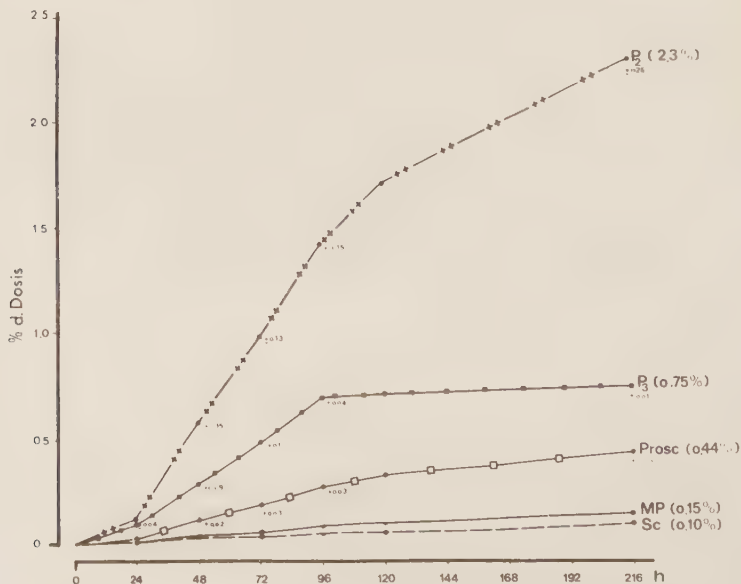


Abb. 7: Kumulative Ausscheidung der CHCl₃-löslichen Bestandteile im Urin
während neun Tagen

3.2.3. in den Faeces

Der CHCl_3 -unlösliche Anteil der Radioaktivität im Stuhl betrug im Gegensatz zu Plasma und Urin 10 % (Tab. 7). Eine Spaltbarkeit dieser Fraktion mit β -Glucuronidase ließ sich nicht nachweisen.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der CHCl_3 -löslichen Fraktion zeigte als Hauptsubstanz Methylproscillaridin (96 %). Daneben wurden Spuren von Scillarenin (1 %) entdeckt (Abb. 8).

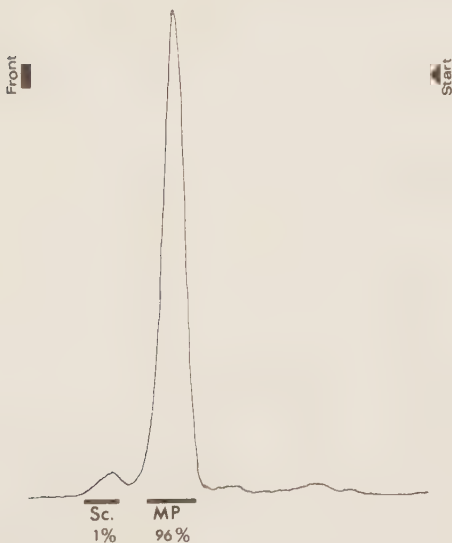


Abb 8: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der CHCl_3 -löslichen Fraktion der Gesamtradioaktivität im Stuhl

3.3. Pharmakokinetik der Gesamtradioaktivität in Plasma, Urin, Stuhl und Galle nach einmaliger oraler Gabe von 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin bei vier Patienten mit Choledochus-T-Drainage

Die Konzentration der Gesamtradioaktivität im Plasma erreichte innerhalb von 1 bis 4 Stunden nach oraler Gabe von 0.5 mg Methylproscillaridin maximale Werte von 2.8 % bis 6.0 % der Dosis pro Liter (Abb. 9). Innerhalb von 6 bis 12 Stunden sank die Radioaktivität rasch ab, um danach in eine langsame Eliminationsphase überzugehen. Die Halbwertszeit betrug bei Patient I.D. und N.A. 18 Stunden und bei Patient D.C. 30 Stunden.

Wegen des nicht monoexponentiellen Abfalles der Plasmaradioaktivität konnte bei Patient I.T. die Halbwertszeit nicht berechnet werden.

Bei Patient I.D. zeigte die Konzentration der Radioaktivität im Plasma 24 Stunden nach oraler Gabe ein zweites Maximum.

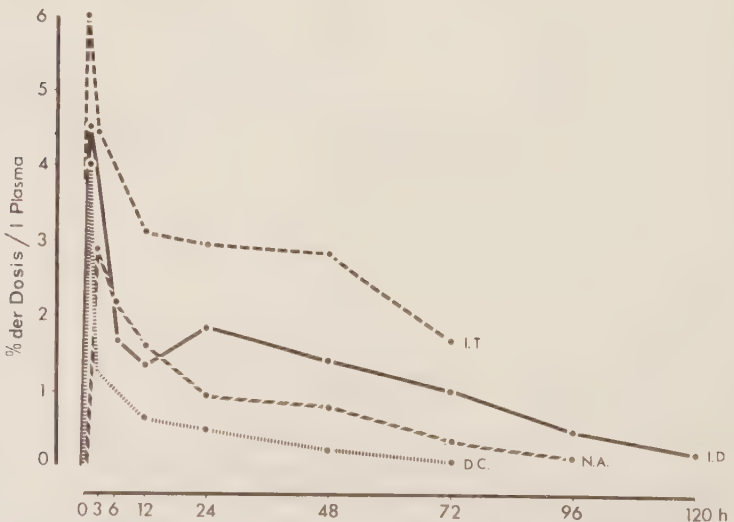


Abb. 9: Verlauf der Gesamtradioaktivität im Plasma von 4 Patienten mit Choledochus-T-Drainage innerhalb von 72 - 120 Stunden nach oraler Gabe von 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin

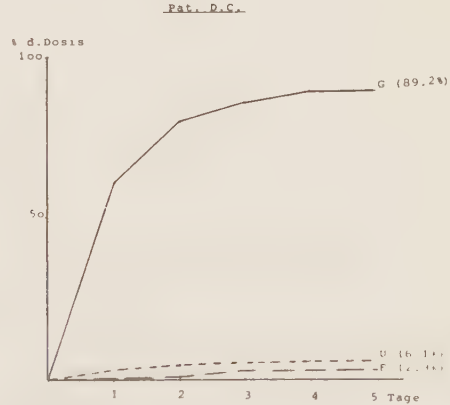
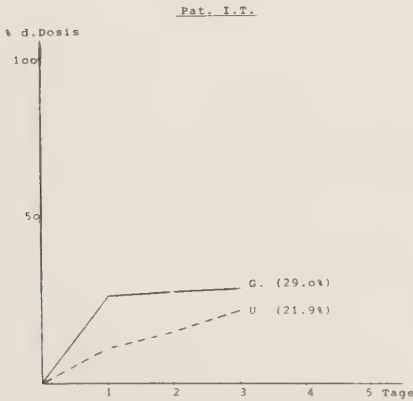
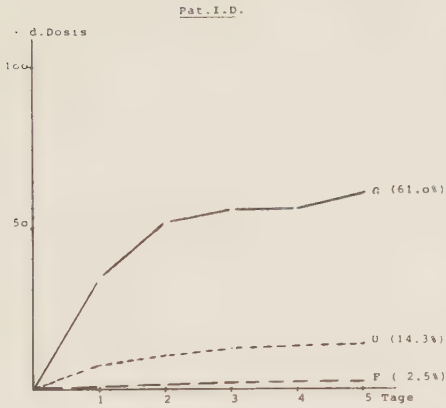


Abb. 10: Ausscheidung der Gesamtradioaktivität in Galle (G), Urin (U) und Faeces (F) innerhalb von 72 bis 120 Stunden nach Gabe von 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin bei vier Patienten mit Choledochus-T-Drainage

Die Ausscheidung der Gesamtradioaktivität im Harn differierte sehr stark zwischen den einzelnen Patienten, und lag zwischen 6 % und 22 % der verabreichten Dosis (Tab. 10 und Abb. 10). Davon wurden bei drei Patienten 52 %, bei Patient N.A. 83 % während der ersten 24 Stunden durch die Nieren eliminiert (Tab. 10).

Die Ausscheidung der Gesamtradioaktivität in der Galle betrug 29 % bis 89 % der Dosis (im Mittel 55 %) (Abb. 10 und Tab. 11).

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, wurden davon bei zwei Patienten über 90 %, bei Patient I.D. 58 % und bei Patient D.C. 68 % in den ersten 24 Stunden wiedergefunden.

Mit den Faeces wurden während des Beobachtungszeitraumes bei drei Patienten 3 % der Gesamtradioaktivität ausgeschieden (Abb. 10 und Tab. 13).

Von Patient I.T. konnten auf Grund mangelnder Mitarbeit keine Stuhlproben erhalten werden.

Zeit	<u>Patient I.D.</u>		<u>Patient N.A.</u>		<u>Patient I.T.</u>		<u>Patient D.C.</u>	
	% Dosis	% d. Gesamtaus- scheidung	% Dosis	% d. Gesamtaus- scheidung	% Dosis	% d. Gesamtaus- scheidung	% Dosis	% d. Gesamtaus- scheidung
0- 12	3.91	27.44	8.55	39.62	7.45	34.03	1.84	30.16
12- 24	3.50	24.56	9.29	43.05	3.82	17.45	1.12	21.64
0- 24	7.41	52.00	17.84	82.67	11.27	51.48	3.16	51.80
24- 48	3.05	21.40	2.32	10.75	4.65	21.24	1.45	23.78
48- 72	2.70	18.95	1.44	6.67	5.96	27.23	0.99	16.23
72- 96	-	-	-	-	-	-	0.37	6.07
96- 120	1.09	7.65	-	-	-	-	0.13	2.13
$\sum_{i=1}^n$	= 14.25		$\sum_{i=1}^n$	= 21.58		$\sum_{i=1}^n$	= 21.88	
							$\sum_{i=1}^n$ = 6.10	

Tab. 10: Ausscheidung der Gesamtradioaktivität im Urin bei 4 Patienten mit Choledochus-T-Drainage (in % der Dosis bzw. % der Gesamtauscheidung)

Patient I.D.				Patient N.A.				Patient I.T.				Patient D.C.							
Zeit	Galle- fluß	Gesamt- radio - aktivität	CHCl ₃ - lösli.	Galle- fluß	Gesamt- radio - aktivität	CHCl ₃ - lösli.	Galle- fluß	Gesamt- radio - aktivität	CHCl ₃ - lösli.	Galle- fluß	Gesamt- radio - aktivität	CHCl ₃ - lösli.	Galle- fluß	Gesamt- radio - aktivität	CHCl ₃ - lösli.				
h	ml	% d.Dosis	%	ml	% d.Dosis	%	ml	% d.Dosis	%	ml	% d.Dosis	%	ml	% d.Dosis	%				
0- 4	38	8.8	20.8	60	20.5	11.1	98	9.3	28.8	72	38.1	19.7							
4- 8	26	6.7	19.7	55	10.3	16.7	100	7.6	14.7	63	6.7	15.6							
8- 12	24	5.6	23.2	38	3.9	13.8	103	6.6	16.9	73	6.4	10.3							
12- 24	101	14.0	17.6	36	2.9	20.5	109	3.9	16.9	105	9.7	22.4							
24- 48	183	17.2	22.1	58	3.0	18.3	310	0.8	25.8	330	18.9	41.5							
48- 72	177	3.4	24.0	29	0.9	11.1	575	0.8	18.3	260	6.0	41.5							
72- 96	30	0.3	39.9	11	0.1	-	-	-	-	265	3.3	32.8							
96-120	255	5.0	24.0	-	-	-	-	-	-	15	0.1	-							
Σ=61.0				x̄=23.9 ±6.9				Σ=41.6 x̄=15.3 ±3.9				Σ=29.0 x̄=20.2 ±5.7				Σ=89.2 x̄=26.3 ±12.5			

Tab. 11: Galle-Fluß (ml), Gesamtradioaktivität (% der Dosis) und prozentualer Anteil der CHCl₃-löslichen Fraktion in den Galleproben der vier Patienten 72 - 120 Stunden nach Gabe von 0.5 mg ³H-Methylproscillaridin

Zeit h	Patient I.D.	Patient N.A.	Patient I.T.	Patient D.C.
	% d.Gesamtausscheidung	% d.Gesamtausscheidung	% d.Gesamtausscheidung	% d.Gesamtausscheidung
0- 12	36.29	83.41	81.34	57.45
12- 24	21.32	6.97	13.13	10.92
0- 24	57.61	90.38	94.47	68.37
24- 48	26.89	7.09	2.78	21.22
48- 72	5.58	2.16	2.88	6.72
72- 96	0.46	0.34	-	3.65
96-120	8.11	-	-	0.04

Tab. 12: Ausscheidung der Radioaktivität in der Galle innerhalb der Sammelperioden bei 4 Patienten mit Choledochus-T-Drainage (in % der Gesamtausscheidung)

<u>Patient I.D.</u>			<u>Patient N.A.</u>			<u>Patient D.C.</u>		
Zeit h	Dosis	CHCl ₃ -löslich (Rel.%)	Zeit h	Dosis	CHCl ₃ -löslich (Rel.%)	Zeit h	Dosis	CHCl ₃ -löslich (Rel.%)
0-120	2.04	78.08	0 - 31	3.248	-	0-48	0.15	84.17
120-144	0.47	-				48-72	2.74	88.28
$\Sigma = 2.51$			$\Sigma = 3.248$			$\Sigma = 2.89$		

Tab. 13: Ausscheidung der Gesamtradioaktivität im Stuhl (in % der Dosis) und CHCl₃-löslicher Anteil (in Rel.%) nach Gabe von 0.5 mg ³H-Methylproscillaridin bei drei Patienten mit Choledochus-T-Drainage

3.4. Methylproscillaridin und seine Metabolite

3.4.1. im Plasma

Nach der Auftrennung der Gesamtradioaktivität im Plasma in eine CHCl_3 -lösliche und - unlösliche Fraktion entfielen bei drei Patienten 65 % bis 77 % auf die CHCl_3 -unlösliche Fraktion (Tab. 14). Dieser Prozentsatz blieb während der Beobachtungsdauer konstant. Bei Patient N.A. wurde der CHCl_3 -unlösliche Anteil nicht bestimmt.

Zeit h	Patient I.D.		Patient I.T.		Patient D.C.	
	% Dosis/l Plasma	CHCl_3 -unlösli. (Rel.%)	% Dosis/l Plasma	CHCl_3 -unlösli. (Rel.%)	% Dosis/l Plasma	CHCl_3 -unlösli. (Rel.%)
0.25	2.2420	56.44	-	-	-	-
0.50	3.8112	71.33	-	-	-	-
0.75	4.5095	72.55	-	-	-	-
1.00	-	-	6.0842	80.53	3.7530	74.84
1.50	4.2518	68.01	-	-	-	-
2.00	3.7420	-	5.0975	78.91	3.1234	82.41
3.00	-	-	4.3578	81.88	1.3544	74.32
6.00	1.7255	73.75	-	-	0.6046	55.96
12.00	1.2905	-	3.0892	76.12	-	-
24.00	1.7697	88.09	2.8531	68.60	0.4393	54.48
48.00	1.4121	-	2.7993	-	0.1969	62.66
72.00	0.9731	-	1.5958	-	0.1362	50.55
96.00	0.4314	-	-	-	-	-
120.00	0.1390	-	-	-	-	-
		$\bar{x} = 71.7$ ± 10.2		$\bar{x} = 77.2$ ± 5.3		$\bar{x} = 65.0$ ± 12.2

Tab. 14: Gesamtradioaktivität (% der Dosis) und CHCl_3 -unlöslicher Anteil (in Rel.%) im Plasma bei drei Patienten mit Choledochus-T-Drainage

3.4.2. im Urin

Die Gesamtradioaktivität wurde in eine CHCl_3 -lösliche und CHCl_3 -unlösliche Fraktion aufgeteilt. Der Anteil der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität an der ausgeschiedenen Gesamtradioaktivität schwankte zwischen 34 % und 16 % (Tab. 15). Er blieb bei allen vier Patienten während der Beobachtungsdauer konstant.

Zeit h	<u>Patient I.D.</u>		<u>Patient N.A.</u>		<u>Patient I.T.</u>		<u>Patient D.C.</u>	
	CHCl_3 - löslich	CHCl_3 - unlöslich	CHCl_3 - löslich	CHCl_3 - unlöslich	CHCl_3 - löslich	CHCl_3 - unlöslich	CHCl_3 - löslich	CHCl_3 - unlöslich
0- 4	-	-	36.04	63.96	20.98	79.02	29.13	70.87
4- 8	33.77	66.23	38.32	61.68	19.15	80.85	25.06	74.94
8- 12	29.26	70.74	42.22	57.78	16.06	83.94	27.77	72.23
12- 24	21.00	79.00	38.28	61.72	16.07	83.93	31.14	68.86
24- 48	23.57	76.43	26.31	73.69	13.25	86.75	40.17	59.83
48- 72	24.22	75.78	22.85	77.15	12.90	87.10	25.08	74.92
72- 96	-	-	-	-	-	-	16.61	83.39
96-120	-	-	-	-	-	-	23.20	76.80
	$\bar{x} = 26.16$ ± 5.11		$\bar{x} = 34.00$ ± 7.64		$\bar{x} = 16.44$ ± 3.23		$\bar{x} = 29.80$ ± 5.97	

Tab. 15: CHCl_3 -löslicher und CHCl_3 -unlöslicher Anteil der Gesamtradioaktivität im Urin nach Gabe von 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin bei vier Patienten mit Choledochus-T-Drainage

Durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der im Urin ausgeschiedenen CHCl_3 -löslichen Radioaktivität konnten unverändertes Methylproscillaridin, Proscillaridin, Scillarenin und zwei unbekannte Metaboliten P_2 und P_3 identifiziert werden (Abb. 11).

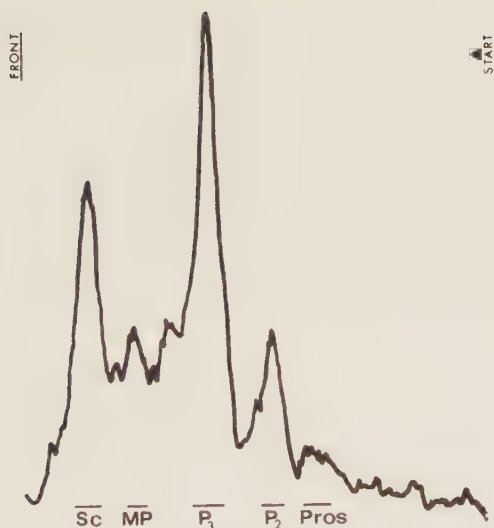


Abb 11: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität im Urin (Patient N.A.)

3.4.3. in den Faeces

In den Faeces waren 78 % bis 88 % der ausgeschiedenen Gesamtradioaktivität CHCl_3 -löslich (Tab. 13).

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung dieser Fraktion ergab 77 % Methylproscillaridin und weniger als 4 % Scillarenin.

3.4.4. in der Galle

11 % bis 42 % der mit der Galle ausgeschiedenen Gesamtradioaktivität waren CHCl_3 -löslich (Tab. 16).

Abbildung 12 I zeigt die chromatographische Auftrennung dieser Fraktion: Methylproscillaridin, Proscillaridin, Scillarenin und die beiden unbekannten Metaboliten P_2 und P_3 .

Eine quantitative Analyse der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität in der Galle war wegen der zu geringen Substanzmenge nicht möglich.

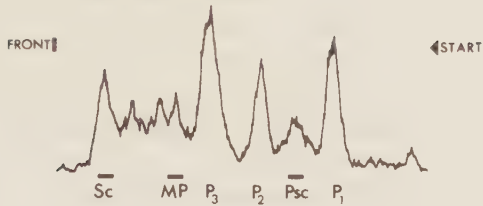
Die CHCl_3 -unlösliche Radioaktivität wurde durch Dünnschichtchromatographie vor und nach Inkubation mit β -Glucuronidase identifiziert (Abb. 12 II).

80 % der CHCl_3 -unlöslichen Radioaktivität konnten mit β -Glucuronidase enzymatisch gespalten werden, wobei sich über 90 % der enzymatischen Spaltprodukte als Methylproscillaridin identifizieren ließen.

Zeit (h)	<u>Pat. I.D.</u>		<u>Pat. N.A.</u>		<u>Pat. I.T.</u>		<u>Pat. D.C.</u>	
	Gesamtausscheidung (% Dosis)	CHCl_3 -lösli. Fraktion (Rel.-%)	Gesamtausscheidung (% Dosis)	CHCl_3 -lösli. Fraktion (Rel.-%)	Gesamtausscheidung (% Dosis)	CHCl_3 -lösli. Fraktion (Rel.-%)	Gesamtausscheidung (% Dosis)	CHCl_3 -lösli. Fraktion (Rel.-%)
0 - 4	8.8	20.8	20.5	11.1	9.1	28.8	18.1	19.7
4 - 8	6.7	19.7	10.1	16.7	7.6	14.7	6.7	15.6
8 - 12	5.6	21.2	1.9	17.8	6.6	16.9	6.4	10.1
12 - 24	14.0	17.6	2.9	20.5	1.9	16.9	9.7	22.4
24 - 48	17.2	22.1	1.0	18.1	0.8	25.8	18.9	41.5
48 - 72	1.4	24.0	0.9	11.1	0.8	18.1	6.0	41.5
72 - 96	0.1	19.9	0.1	-	-	-	1.1	12.8
96 - 120	5.0	24.0	-	-	-	-	0.1	-

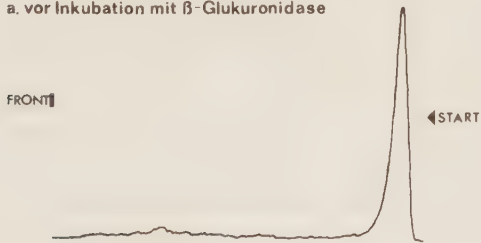
Tab. 16: Gesamtausscheidung und CHCl_3 -löslicher Anteil durch die Galle ausgeschiedener Radioaktivität nach oraler Gabe von 0,5 mg ^3H -Methylproscillaridin bei vier Patienten mit Choledochus-T-Drainage

I CHCl_3 -lösliche Fraktion



II CHCl_3 -unlösliche Fraktion

a. vor Inkubation mit β -Glukuronidase



b. nach Inkubation mit β -Glukuronidase

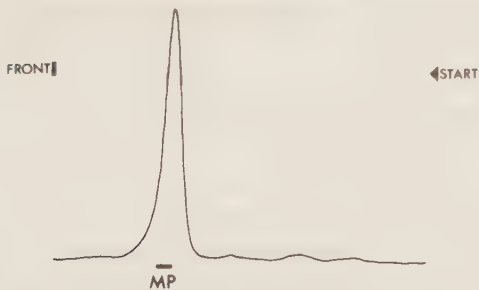


Abb. 12 : I. Radiochromatogramm der CHCl_3 -löslichen Radioaktivität in der Galle

II. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der CHCl_3 -unlöslichen Fraktion vor (a) und nach (b) Inkubation mit β -Glukuronidase

4. D i s k u s s i o n

In Analogie zu den Untersuchungen von RIETBROCK und STAUD (1975) zeigt die vorliegende Arbeit, daß Pharmakokinetik und Metabolismus von Methylproscillaridin nach einmaliger und repetierter oraler Applikation nicht verschieden sind. Methylproscillaridin wird von gesunden Probanden sowohl nach einmaliger als auch wiederholter Gabe zu fast 60 % unverändert auf faecalem Wege ausgeschieden. Bei Patienten mit Choledochus-T-Drainage werden in Galle und Urin bis zu 90 % der applizierten Dosis wiedergefunden. Somit muß als Ursache für die hohe faecale Ausscheidung von unverändertem Methylproscillaridin die biliäre Sekretion verantwortlich gemacht werden. Aufgrund dieser Untersuchungen läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß die enterale Resorption von Methylproscillaridin aus einer alkoholischen Lösung ca. 80 - 90 % beträgt. Die Resorptionsquote stimmt mit Untersuchungen von BELZ et al. (1974 b, 1976) überein, die nach einmaliger oraler Gabe von 1.2 mg Methylproscillaridin-Tabletten bei 16 gesunden Probanden eine biologische Verfügbarkeit von fast 70 % nachwiesen. KRÄMER et al. (1976) ermittelten nach Verabreichung von durchschnittlich 1.34 mg Methylproscillaridin bei 20 herzkranken Patienten mit klinischen und röntgenologischen Zeichen einer kardialen Dekompensation eine relative enterale Verfügbarkeit von 60 %. Damit ist die biologische Verfügbarkeit von Methylproscillaridin vergleichbar mit der des Digoxin (GUGGENMOS 1974, GREENBLATT et al. 1976, RIETBROCK 1976).

Die höhere Verfügbarkeit von Methylproscillaridin gegenüber dem Proscillaridin ist nach BERGDAHL (1977) wahrscheinlich auf einen geringeren First-Pass-Metabolismus zurückzuführen. Die größere Verfügbarkeit von Methylproscillaridin kann nicht durch eine erhöhte Stabilität im Verdauungstrakt erklärt werden, da Methylproscillaridin die gleiche Instabilität in einem sauren Milieu zeigte wie Proscillaridin (BERGDAHL et al. 1977 a). Nach Ansicht der gleichen Autoren kann die schnelle Inaktivierung des Glykosids bei einem niedrigen pH im Ma-

gensaft die inter- und intraindividuellen Unterschiede in der Bioverfügbarkeit verursachen.

Für das unterschiedliche Ausmaß der durch die Galle wieder - gewonnenen Radioaktivität bei den einzelnen Patienten (29 - 89 % der Dosis) sind primär die verschiedenen postoperati - ven Umstände verantwortlich zu machen, da eine chirurgisch gelegte T-Drainage nur selten komplett den Gallengang ver - legt und ein bestimmter Anteil der sezernierten Galle daher in das Darmlumen gelangt. Gleiche Beobachtungen wurden von DOHERTY et al. (1970) für Digoxin und von KUHLMANN et al. (1974) für das Digoxigenin-mono-digitoxosid erhoben.

Die Halbwertszeit von Methylproscillaridin in Plasma und Urin beträgt ungefähr 30 Stunden und stimmt mit den von BELZ et al. (1974 a, 1976) ermittelten Werten überein; sie ist ver - gleichbar mit der Halbwertszeit des Digoxin (DOHERTY 1961).

Grundsätzliche Unterschiede bestehen in der Elimination der beiden Glykoside, da Digoxin überwiegend über die Niere ausgeschieden wird (DOHERTY et al. 1962, 1964, 1967 und 1968, BLOOM et al. 1966, MARCUS et al. 1964, 1966, KRAMER et al. 1972, RIETBROCK et al. 1977, 1977 a).

ANDERSSON et al. (1977) wiesen einen enterohepatischen Kreislauf für Proscillaridin nach, und die Untersuchungen von RIETBROCK und STAUD (1975) deuteten in diesem Zusammen - hang darauf hin, daß auch Methylproscillaridin und seine Metaboliten einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen. Dies wird durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Durch die - se Tatsache ist auch die Verkürzung der Halbwertszeit im Plasma bei zwei Patienten mit Choledochus-T-Drainage zu er - klären. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KATZUNG und MEYERS (1965), die bei Hunden mit Choledo - chus-T-Drainage eine Verkürzung der biologischen Halbwert - zeit für ^3H -Digitoxin von 14 Stunden auf 6 Stunden feststell - ten, und den Untersuchungen von ABSHAGEN et al. (1972), die nach Gabe von ^3H -Digoxin bei Ratten eine Verkürzung der Halb - wertszeit von 13.5 Stunden auf 7 Stunden bei Ratten mit bili -

ärer Fistel fanden. Für die Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes spricht auch folgender Befund: Die Ausscheidung von Methylproscillaridin im Stuhl verminderte sich von im Mittel 58 % bei gesunden Probanden auf 3 % bei Patienten mit Choledochus-T-Drainage; die Urinausscheidung blieb in beiden Gruppen gleich hoch. DOHERTY et al. (1970) beobachteten einen Rückgang der Gesamtausscheidung von Digoxin im Stuhl von 11.3 % der Dosis nach intravenöser Gabe bei Normalpersonen auf 1.3 % bei Patienten mit biliärer Fistel.

Wie ferner in dieser Arbeit gezeigt wurde, bestand der größte Anteil der über die Galle ausgeschiedenen Radioaktivität aus chloroform-unlöslichen Produkten, nämlich Glukuroniden. Im Stuhl dagegen erschien die ausgeschiedene Radioaktivität als chloroform-lösliche Aktivität. Das bedeutet, daß die Glukuronide im Darm durch intestinale Bakterien gespalten werden, Methylproscillaridin nach der Spaltung reabsorbiert wird und einem enterohepatischen Kreislauf unterliegt.

In der Literatur ist eine große Zahl gleichartiger Beobachtungen über die Hydrolyse von Glukuroniden im Darm beschrieben worden: So berichteten HUCKER et al. (1966) über die Hydrolyse der Indomethazin-Glukuronide bei Hunden, wobei das freigesetzte Indomethazin sowohl einem enterohepatischen Kreislauf unterliegt als auch über die Faeces ausgeschieden wird. Das Gleiche stellten COCHIN et al. (1954) und WOODS et al. (1954) für Morphin fest. Glutethimid wird bei Ratten weitgehend mit der Galle als Glukuronid ausgeschieden und seine langsame Reabsorption aus dem Darmlumen läßt auf eine zunächst stattfindende Hydrolyse schließen (KEBERLE et al. 1962). ABSHAGEN et al. fanden bei Ratten (1973) bzw. beim Menschen (1974) und KUHLMANN et al. beim Menschen (1974) eine Spaltung von Konjugaten des Digoxigenin-mono-digitoxosids. Ebenso führten VÖHRINGER et al. (1974) die faecale Ausscheidung von Digitoxigenin-mono-digitoxosid auf eine bakterielle Hydrolyse der polaren Konjugate während der Colon-Passage zurück. Diese Annahme wurde bereits von KATZUNG und MEYERS (1965) postu-

liert, die nach Gabe von ^3H -Digitoxin bei Hunden eine Abnahme in der Konzentration polarer Metaboliten von oberen zu unteren Abschnitten des Darmes fanden. Für Proscillaridin A wiesen ANDERSSON et al. (1977) die Konjugation der unveränderten Substanz nach und deuteten ihre Ergebnisse ebenfalls so, daß die Konjugate nach der Ausscheidung über die Galle im Darm gespalten und als aktives Glykosid reabsorbiert werden. Für die Spaltung im Darm verantwortlich sein könnten nach BUEHLER et al. (1961), SCHELIN et al. (1968) und HAWKSWORTH et al. (1971) *Escherichia coli* und nicht-sporenbildende Anaerobier. Zu dieser Schlußfolgerung kamen auch ABSHAGEN et al. (1974), die nach Gabe von Methyldigoxin beim Menschen die durch die Galle ausgeschiedene polare Fraktion mit Stuhlsuspensionen inkubiert hatten. ANDERSSON et al. (1977) inkubierten nach einmaliger Gabe von 1.0 - 1.5 mg Proscillaridin A die gewonnenen Galleproben mit faecalem Material *in vitro* und fanden eine fast vollständige Spaltung der Proscillaridin-Konjugate.

Auf Grund der Befunde von GREENBERGER et al. (1969), daß die Absorption von Digoxin in proximalen Darmschlingen signifikant höher ist als in distalen Darmschlingen, und den Beobachtungen von RIETBROCK et al. (1972), daß Digoxin bei Ratten im Duodenum doppelt so hoch resorbiert wird wie im Ileum, kann für die hohe faecale Ausscheidung von unverändertem Methylproscillaridin angenommen werden, daß der Ort der enzymatischen Spaltung die distalen Darmsegmente sind, in denen eine schlechtere Resorption des Glykosids stattfindet.

Bei der Auswertung der Konzentration im Plasma fiel der 24-Stunden-Wert von Patient I.D. auf, der zu diesem Zeitpunkt ein zweites Maximum zeigte. Einen gleichartigen zweiten Anstieg der Plasmakonzentration für Proscillaridin fanden BELZ et al. (1974 c) nach einmaliger oraler Gabe und ANDERSSON et al. (1977 a, 1977 b, 1977 c) nach oraler Gabe von Proscillaridin.

Für das Methylproscillaridin beschrieben BELZ et al. (1976)

sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Gabe von 1.2 mg Methylproscillaridin einen zweiten Plasma-Peak zwischen der 4. und 10. Stunde und RIETBROCK et al. (1975) nach Gabe von 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin bei 2 von 5 Probanden zwischen der 6. und 12. Stunde.

Auch in der Gruppe der Digitalisglykoside ist das gleiche Verhalten beobachtet worden: Für Digoxin von STEWART et al. (1972) und SHAW et al. (1972), für das Digoxigenin-mono-digoxosid von KUHLMANN et al. (1974) und für das Digitoxin von VÖHRINGER et al. sowohl bei gesunden Probanden (1974) als auch bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (1976). Der erneute Anstieg der Konzentration im Plasma könnte einerseits auf die Bildung von chloroform-unlöslichen Metaboliten zurückzuführen sein, die ein kleineres Verteilungsvolumen besitzen als die unveränderte Substanz. Als Beweis für diese Annahme kann bei Patient I.D. die Erhöhung des chloroform-unlöslichen Anteils im Plasma zwischen der 6. und 24. Stunde von 74 % auf 88 % anzusehen sein. Auf der anderen Seite wird Methylproscillaridin, wie in dieser Arbeit dargestellt, im Darm dekonjugiert und unterliegt einem intensiven enterohepatischen Kreislauf. Dieses würde eine weitere Erklärung für einen erneuten Anstieg der Plasmakonzentration sein. ANDERSSON et al. (1977) kamen zu der gleichen Schlussfolgerung in ihrer Untersuchung über die biliäre Ausscheidung und den enterohepatischen Kreislauf von Proscillaridin A.

Die chloroform-unlösliche Fraktion im Plasma wird wahrscheinlich analog dem Digoxin und Digitoxin (REPKE 1963, LÜLLMANN et al. 1971) nur eine geringe oder gar keine Herzwirksamkeit besitzen. Letztere wird von der chloroform-löslichen Fraktion zu erwarten sein, die in der Hauptsache die unbekannten Metaboliten P_2 und P_3 enthält.

Es ist anzunehmen, daß Metabolit P_3 zum Metaboliten P_2 umgebildet wird, da, wie im Ergebnisteil dargestellt wurde, die Ausscheidung des Metaboliten P_2 im Urin von 24 % während der ersten 24 Stunden nach letzter Applikation auf 5 % im darauffolgenden Beobachtungszeitraum abfiel, während sich der Anteil von P_2 von 44 % während der ersten 24 Stunden auf 64 %

erhöhte. Das gleiche Verhalten beider Metaboliten fanden RIETBROCK et al. (1975) nach einmaliger Gabe von Methylproscillaridin. Die Hypothese der Umwandlung von P_3 zu P_2 konnte auch in dieser Arbeit nicht durch eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der chloroform-löslichen Fraktion bewiesen werden, da die Konzentration dieses Anteils zu niedrig war.

Bevor Methylproscillaridin in die Therapie der Herzinsuffizienz eingeführt wird, müßte noch die Struktur dieser beiden unbekannten Metaboliten aufgeklärt und deren Herzwirksamkeit überprüft werden.

Damit wäre diese Substanz bezüglich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften mit einer enteralen Resorptionsquote von 80 - 90 %, einer Halbwertszeit im Plasma von ungefähr 30 Stunden und ihrer Unabhängigkeit von der glomerulären Filtrationsleistung ein Glykosid, daß vornehmlich für Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion geeignet wäre.

5. Zusammenfassung

3 gesunde männliche Versuchspersonen erhielten über 7 Tage täglich per os 0.5 mg inaktives Methylproscillaridin in Tablettenform und vom 8. bis 11. Tag 0.42 mg inaktives Methylproscillaridin + 0.08 mg ^3H -Methylproscillaridin in alkoholischer Lösung per os verabfolgt. Der Plasmaspiegel erreichte sein Maximum innerhalb von 24 Stunden nach letzter Applikation. Die Halbwertszeit betrug im Mittel 30 Stunden. Die im Urin während der Beobachtungsdauer ausgeschiedene Radioaktivität betrug 13 - 18 % der Dosis; mit den Faeces wurden im gleichen Zeitraum 47 - 68 % der Dosis ausgeschieden. Der CHCl_3 -unlösliche Anteil betrug im Mittel im Plasma 57.5 %, im Urin 78 % und in den Faeces 10 %. Davon konnten im Urin 39 % mit β -Glucuronidase gespalten werden, wovon sich 97 % als Methylproscillaridin identifizieren ließen. Durch dünn-schichtchromatographische Auftrennung der CHCl_3 -löslichen Fraktion konnten im Urin neben Methylproscillaridin, Proscillaridin und Scillarenin als Hauptsubstanzen zwei unbekannte Metaboliten nachgewiesen werden. In den Faeces wurden 90 % der CHCl_3 -löslichen Fraktion als unverändertes Methylproscillaridin identifiziert.

3 männliche Patienten und 1 weiblicher Patient mit Choledochus-T-Drainage, die herz- und nierengesund waren, erhielten einmalig per os 0.5 mg ^3H -Methylproscillaridin. Der Plasmaspiegel erreichte sein Maximum innerhalb der ersten 4 Stunden. Die Halbwertszeit betrug bei 2 Patienten 18 Stunden und bei einem Patient 30 Stunden. Im Mittel wurden mit der Galle 55 %, mit dem Urin 16 % und mit den Faeces 3 % der Dosis ausgeschieden. Mehr als 60 % der mit Galle und Urin ausgeschiedenen Radioaktivität erschien innerhalb der ersten 24 Stunden. 78 % der mit der Galle ausgeschiedenen Radioaktivität war CHCl_3 -unlöslich. 80 % dieser Fraktion konnte mit β -Glucuronidase enzymatisch gespalten werden, 90 % der enzymatischen Spaltprodukte ließen sich als Methylproscillaridin identifizieren. Die dünn-schichtchromatographische Auftrennung

der CHCl_3 -löslichen Bestandteile zeigte Methylproscillaridin, Proscillaridin, Scillarenin und die beiden unbekannten Metabolite P_2 und P_3 .

Es wurde gezeigt, daß die hohe Lipoidlöslichkeit von Methylproscillaridin eine nahezu vollständige Resorption aus einer alkoholischen Lösung bedingt. Die Halbwertszeit ist vergleichbar mit der des Digoxins, wobei Methylproscillaridin im Gegensatz zum Digoxin einem intensiven Stoffwechsel zu einem wasserlöslichen Glukuronid-Konjugat und mehreren chloroformlöslichen Metaboliten unterliegt. Methylproscillaridin und seine Metaboliten werden hauptsächlich biliär ausgeschieden, im Darm durch intestinale Bakterien gespalten und nach der Spaltung reabsorbiert. Somit unterliegt die Substanz einem enterohepatischen Kreislauf. Diskutiert werden die für die Spaltung im Darm verantwortlichen Bakterien und der Ort der enzymatischen Spaltung im Darm.

Vor der Einführung von Methylproscillaridin in die Therapie der Herzinsuffizienz müßte noch die Struktur der unbekannten Hauptmetaboliten aufgeklärt und deren Herzwirksamkeit überprüft werden.

6. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- ABSHAGEN U., BERGMANN K.v., RIETBROCK N.: Evaluation of the enterohepatic circulation after ^3H -Digoxin administration in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275, 1-10, 1972
- ABSHAGEN U., RIETBROCK N.: Metabolism of Digoxigenin, Digoxigeninmonodigitoxoside and Digoxigeninbisdigitoxoside in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 157-166, 1973
- ABSHAGEN U., RENNEKAMP H., KÜCHLER R., RIETBROCK N.: Formation and disposition of Bis- and Monoglycosides after administration of ^3H -4'''-Methyldigoxin to man. Europ. J. clin. Pharmacol. 7, 177-181, 1974
- ANDERSSON K.-E., BERGDAHL B., WETTRELL G.: Biliary excretion and enterohepatic recycling of Proscillaridin A after oral administration to man. Europ. J. clin. Pharmacol. 11, 273-276, 1977
- ANDERSSON K.-E., BERGDAHL B., BERTLER A., REDFORS A.: On the absorption of Proscillaridin A after single oral doses to normal and achlorhydric subjects. Acta Pharmacol. Toxicol. (Kbh) 40, 156-160, 1977 a
- ANDERSSON K.-E., BERGDAHL B., DENCKER H., WETTRELL G.: Activities of Proscillaridin A in thoracic duct lymph after single oral doses in man. Acta Pharmacol. Toxicol. (Kbh) 40, 280-284, 1977 b
- ANDERSSON K.-E., BERGDAHL B., DENCKER H., WETTRELL G.: Proscillaridin activity in portal and peripheral venous blood after oral administration to man. Europ. J. clin. Pharmacol. 11, 277-281, 1977 c
- BARLOW J.J., KELLIE A.E.: A quantitative method for the chromatographic separation of 17-oxo-steroid sulfates from 17-oxo-steroid glucuronides: with observation on the behaviour of conjugated corticosteroids on the same system. Biochem. J. 71, 86-91, 1959
- BELZ G.G.: Klinisch-experimentelle Untersuchungen mit dem Herzglykosid Proscillaridin unter besonderer Berücksichtigung

- sichtigung seiner enteralen Resorptionsquote. Med. Klin. 63, 96-102, 1968
- BELZ G.G., BRECH W.J., RUDOWSKY G., HÄRICH B., NISSEN H., FRANZ E., STAUCH M.: Plasmaspiegel und Halbwertszeiten von Proscillaridin bei gesunden und niereninsuffizienten Versuchspersonen. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 79. Band, 1044-1047, 1973
- BELZ G.G., BRECH W.J.: Plasmaspiegel und Kumulationsverhalten von Proscillaridin bei Niereninsuffizienz. Klin. Wschr. 52, 640-644, 1974
- BELZ G.G., NÜBLING H., SCHMIDT-WIEDERKEHR P., FRANZ H.E.: Plasmakonzentrationen und Elimination von Methylproscillaridin bei Niereninsuffizienz. Klin. Wschr. 52, 1078-1081, 1974 a
- BELZ G.G.: Studies on pharmacokinetics of Proscillaridin 4'-methylether in man. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282, R 7, 1974 b
- BELZ G.G., STAUCH M., RUDOWSKY G.: Plasma levels after a single oral dose of proscillaridin. Europ. J. clin. Pharmacol. 7, 95-97, 1974 c
- BELZ G.G., SCHREITER H., WOLF G.K.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Methylproscillaridin in healthy man. Europ. J. clin. Pharmacol. 10, 101-108, 1976
- BERGDAHL B.: An account of Proscillaridin with special reference to its pharmacokinetics. Akademisk Avhandling som för Avläggande av Medicine Doktorsexamen. Linköping University Medical Dissertations No. 50, Linköping 1977
- BERGDAHL B., ANDERSSON K.-E.: Stability in vitro of Methylproscillaridin. Europ. J. clin. Pharmacol. 11, 267 - 271, 1977 a
- BLOOM P.M., NELP W.B.: Relation of the excretion of tritiated digoxin to renal function. Amer. J. Sci. 251, 133-144, 1966
- BODEM G., WIRTH K.: Neue Aspekte in der Therapie mit Digitalis. Herz/Kreislauf 7, 575-580, 1975
- BUEHLER H.J., KATZMAN P.A., DOISY E.A.: Studies on β -Glucu -

- ronidase from *E. coli* . Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76, 672-676, 1961
- BUTZENGEIGER K.H., GRAEBER K., LANGE J., SCHUMACHER R.: Therapeutische Prüfung von Proscillaridin A . Dtsch. med. Wschr. 92, 2212-2217, 1967
- CERLETTI A.: Pharmakologie der Herzglykoside. Verh. dt. Ges. f. Kreislaufforschung, Bd. 26, 1 - 8, 1960
- COCHIN J., HAGGART J., WOODS L.A., SEEVERS M.H.: Plasma levels, urinary and fecal excretion of Morphine in non-tolerant and tolerant dogs. J. Pharmacol. exptl. Therap. 111, 74-83, 1954
- DOHERTY J.E., PERKINS W.H., MITCHELL G.K.: Tritiated Digoxin-Studies in human subjects. Arch. Int. Med. 108, 531-539, 1961
- DOHERTY J.E., PERKINS W.H.: Studies with tritiated Digoxin in human subjects after intravenous administration. Am. Heart J. 63, 528-536, 1962
- DOHERTY J.E., PERKINS W.H., WILSON M.C.: Studies with tritiated Digoxin in renal failure. Amer. J. Med. 37, 536-544, 1964
- DOHERTY J.E., FLANIGAN W.J., PERKINS W.H., ACKERMAN G.L.: Studies with tritiated Digoxin in anephric human subjects. Circulation 35, 298-303, 1967
- DOHERTY J.E., FLANIGAN W.J., PERKINS W.H.: Tritiated Digoxin excretion of patients following renal transplantation. Circulation 37, 865-869, 1968
- DOHERTY J.E., FLANIGAN W.J., MURPHY M.C., BULLOCH R.T., DALRYMPLE G.L., BEARD O.W., PERKINS W.H.: Tritiated Digoxin -- Enterohepatic circulation, absorption, and excretion studies in human volunteers. Circulation 42 867-873, 1970
- DWENGER A.: Chemie, Biochemie und klinische Pharmakologie der Digitalisglykoside. Arzneim. Forschg. (Drug Res.) 23, 1439-1446, 1973
- FRHRING H., KOCH F.E., LORENZ D., MADAUS R., ORZECOWSKI G., PATT P.: Therapie mit nativen Convallaria-Glykosiden. Chemische, pharmakologische und klinische Betrachtun-

- gen. Medizinische 35, 1326-1331, 1958
- GOLD H., CATELL MC.K.: The influence of digitalis glycosides on the force of contraction of mammalian cardiac muscle. J. of Pharmacol. 62, 116, 1938
- GREENBERGER N.J., MAC DERMOTT R.P., MARTIN J.F., DUTTA S.: Intestinal absorption of six tritium-labeled digitalis glycosides in rats and guinea pigs. J. Pharmacol. exptl. Therap. 167, 265-273, 1969
- GREENBLATT D.J., SMITH T.W., KOCH-WESER J.: Bioavailability of drugs: The digoxin dilemma. Clin. Pharmacokinetics 1, 36-51, 1976
- GRÜBL M., KLEIN K., SIEDECK H.: Klinische und experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Proscillaridin A. Wien. Med. Wschr. 120, 51-55, 1970
- GUGGENMOS D.J.: Biologische Verfügbarkeit ("bioavailability") von Digoxin und Derivaten aus festen galenischen Zubereitungen. Inaugural-Dissertation, Med. Fachbereiche der FU - Berlin, 1974
- HÄNEL J., MEIFFERT G.: Klinisch-experimentelle Studie zur Charakterisierung eines Herzglykosids. Med. Welt 17, 1404-1408, 1966
- HANSEL J.: Klinische Untersuchungen mit dem neuen Herzglykosid Proscillaridin A (Sandoscall^R). Med. Klin. 63, 919-922, 1968
- HAWKSWORTH G., DRASAR B.S., HILL M.J.: Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. J. Med. Microbiol., Vol. 4, 451-459, 1971
- HUCKER H.B., ZACCHEI A.G., COX S.V., BRODIE D.A., CANTWELL N.H.R.: Studies on the absorption, distribution and excretion of Indomethazin in various species. J. Pharmacol. exptl. Therap. 153, 237-249, 1966
- KAISER F.: Die papierchromatographische Trennung von Herzgiftglykosiden. Chem. Ber. 88, 556-563, 1955
- KAISER F.: Teilsynthetische Herzglykosidderivate mit verbesserter enteraler Wirksamkeit. 28. Mitteilung über Herzglykoside. Planta med. 20, Suppl. 4, 52-60, 1971
- KATZUNG B.G., MEYERS F.H.: Excretion of radioactive Digitalis

- xin by the dog. J. Pharmacol. exptl. Therap. 149, 257-262, 1965
- KEBERLE H., HOFFMANN K., BERNHARD K.: The metabolism of Glutethimid (Doriden^R). Experientia 18, 105-111, 1962
- KRAMER P., SCHELER F.: Renale Eliminationskinetik verschiedener Herzglykoside. Dtsch. med. Wschr. 97, 1485-1490 1972
- KRÄMER K.-D., HOCHREIN H.: Enterale Verfügbarkeit und therapeutische Wirksamkeit von Proscillaridin-4'-methyläther. Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 26, 579-583, 1976
- KUBICEK F., LINDNER A., POLZER K.: Zur Pharmakologie und therapeutischen Anwendung des Proscillaridin A. Wien. klin. Wschr. 77, 12-16, 1965
- KUBINYI H.: Proscillaridinmethyläther. Arch. pharm. (Weinheim) 304, 531-543, 1971
- KUHLMANN J., ABSHAGEN U., RIETBROCK N.: Pharmacokinetics and metabolism of Digoxigenin-mono-digitoxoside in man. Europ. J. clin. Pharmacol. 7, 87-94, 1974
- LÖSCHHORN N.: Probleme der quantitativen Prüfung von Herzglykosiden, dargestellt an Proscillaridin. Therapiewoche 19, 1529-1532, 1969
- Loubatieres A.: Mécanisme d'action des substances digitales. Actualité pharmacologiques, 3^{ème} série, 69 Masson et Cie, Paris 1951
- LÜLLMANN H., PETERS T.: The cardioactivity of digitoxin metabolites. Europ. J. Pharmacol. 14, 204-205, 1971
- MARCUS F.J., KAPADIA G.J., KAPADIA G.G.: The metabolism of Digoxin in normal subjects. J. Pharmacol. exptl. Therap. 145, 203-209, 1964
- MARCUS F.J., PETERSON A., SALEL A., SCULLY J., KAPADIA G.G.: The metabolism of tritiated digoxin in renal insufficiency in dogs and man. J. Pharmacol. exptl. Therap. 152, 372-382, 1966
- MEIER G., WAGNER G.: Proscillaridin A. Med. Welt 35, 1995-2002, 1965
- ORZECOWSKI G.: Herzmuskel und Herzglykosid. Med. Welt 35, 1712-1719, 1960

- REPKE K.: Metabolism of cardiac glykosides. Proc. First Int. Pharmacol. Meetg., Stockholm 1961, Vol. 3 p. 47, Oxford: Oxford University Press 1963
- REPKE K.: Biochemie und Klinik der Digitalis. Internist 8, 418-425, 1966
- RIETBROCK N., ABSHAGEN U., BERGMANN K.v., KEWITZ H.: Pharmacokinetics of digoxin and its 4''' acetyl- and methyl-derivates in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 171-181, 1972
- RIETBROCK N., STAUD R.: Metabolism and Excretion of Methyl -proscillaridin in man. Europ. J. clin. Pharmacol. 8, 427-432, 1975
- RIETBROCK N.: Therapeutische Gleichwertigkeit und Ungleichwertigkeit chemisch identischer Stoffe (insbesondere am Beispiel der Herzglykoside). Arzneim. Forschg. (Drug Res.) 26, 1 a, 135-146, 1976
- RIETBROCK N., KUHLMANN J., VÖHRINGER H.-F.: Pharmakokinetik von Herzglykosiden und klinische Konsequenzen. Fortschr. Med. 95, 909-915, 951-954, 1977
- RIETBROCK N., KUHLMANN J.: Pharmakokinetische und klinische Aspekte der Glykosidtherapie bei Herzinsuffizienz. Med. Klin. 72, 435-449, 1977 a
- SCHAUMANN W., ZIELSKE F., KOCH K.: β -Methyl-Digoxin. III. Speed of absorption in guinea-pigs in comparison to other cardiac glycosides. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 272, 32-45, 1972
- SCHELINE R.R.: Drug metabolism by intestinal microorganisms. J. pharm. Sci. 57, 2021-2037, 1968
- SHAW T.R.D., HOWARD M.R.: Value of Plasma-digoxin estimation. Lancet 2, 770-771, 1972
- STEWART M.J., SIMPSON E.: Value of Plasma-digoxin estimation. Lancet 2, 493, 1972
- STRAUB W.: Die Elementarwirkung der Digitaliskörper. Sitzungsber. phys. u. med. Ges. 85, Würzburg 1907
- STRAUBE W.: Zur Pharmakologie und Klinik der Scillaglykoside. Ther. d. Gegenw. 98, 215-219, 1959
- VÖHRINGER H.-F., RIETBROCK N.: Metabolism and excretion of

Digitoxin in man. Clin. Pharmacol. Therap. 16, 796 - 806, 1974

VÖHRINGER H.-F., RIETBROCK N., SPURNY P., KUHLMANN J., HAMPL H., BAETHKE R.: Disposition of digitoxin in renal

failure. Clin. Pharmacol. Therap. 19, 387-395, 1976

WOODS L.A.: Distribution and fate of Morphine in nontolerant and tolerant dogs and rats. J. Pharmacol.exptl. Therap. 112, 158-175, 1954

WÜLFING von der HEYDEN D.: Beitrag zur quantitativen und qualitativen Prüfung des Reinglykosids Proscillari - din. Med. Welt 13, 738-743, 1969

Herrn Prof. Dr. med. Norbert Rietbrock danke ich für die Themenstellung, dauernde Unterstützung und wertvolle Anregungen bei der Durchführung der Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. med. Roland Staud, Frau Jutta-Maria Gwosdz und allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für ihre theoretische und praktische Hilfe.

L e b e n s l a u f

Am 1.4.1951 wurde ich als Sohn des Dr. med. Hans Faßbender und seiner Ehefrau Christina, geb. Daub in Köln geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Thomasberg wechselte ich auf das Neusprachliche Ernst - Kalkuhl - Gymnasium in Bonn - Oberkassel, an dem ich im Juni 1969 mein Abitur bestand. Ich studierte zunächst fünf Semester Chemie an der Rheinischen Friedrich - Wilhelm - Universität zu Bonn. Im Rahmen dieses Studiums legte ich im März 1972 mein Vorphysikum ab. Vom Sommersemester 1972 an studierte ich Medizin an den medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin. Hier bestand ich am 18.2. 1977 das Staatsexamen. Im April 1974 begann ich mit der vorliegenden Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie des Klinikum Steglitz, Berlin. Im gleichen Institut bin ich seit dem 1.4.1977 als Medizinalassistent beschäftigt.

